Aus dem Physiologischen Institut I der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Karl Brecht

Der Einfluß von K^+-, Cl^--Ionen und osmotischem Druck auf das Membranpotential von Arterien muskulären Typs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank Hillenbrand
aus Tübingen

1969

Aus dem Physiologischen Institut I der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Karl Brecht

Der Einfluß von K^+-, Cl^--Ionen und osmotischem Druck auf das Membranpotential von Arterien muskulären Typs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank Hillenbrand
aus Tübingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

Berichterstatter: Professor Dr. med. K. Brecht

Inhalt

Einleitung	Seite 1
Methodik	2
Ergebnisse	5
Diskussion	7
Zusammenfassung	9
Abbildungen	11
Literatur	12

Einleitung

Bei der Herz- und Skelettmuskulatur sind die Rolle des Membranpotentials bei der Erregungs-Kontraktionskoppelung und die Bedeutung des K^+-Konzentrationsgradienten für die Entstehung des Membranpotentials anerkannt. Bei der glatten Muskulatur des Warmblüters, vor allem bei der Gefäßmuskulatur der Arterien, werden feste Beziehungen zwischen Spannungsentwicklung und Membranpotential von vielen Autoren in Frage gestellt (SOMLYO und SOMLYO 1967). Auch die Bedeutung der einzelnen Ionen für die Membranpotentialentstehung ist noch nicht gesichert.

Die Beziehungen zwischen Außenmilieu und Membranpotential einerseits und dem Membranpotential und dem kontraktilen Tonus andererseits haben besondere Bedeutung für die Aufklärung der Reaktionsmechanismen der Widerstandsgefäße im Skelettmuskel, vor allem bei der Arbeitshyperämie. Für diesen Regulationsvorgang scheint die K^+-Konzentration an der glatten Muskulatur der Arterien und Arteriolen wichtig zu sein. Das bei Muskelarbeit freiwerdende Kalium kann die extracelluläre K^+-Konzentration um ca. 100 % erhöhen (KJELLMER 1961). Diese Steigerung reicht aus, um sowohl am Gefäßbett des Muskels (DAWES 1941, KJELLMER 1965, SKINNER und POWELL 1967) als auch an der isolierten muskulären Arterie (KONOLD, GEBERT u. BRECHT 1968) eine erhebliche Abnahme des Strömungswiderstandes auszulösen.

Neben der K^+-Konzentration im Interstitium des Skelettmuskels sind auch Veränderungen des osmotischen Druckes mit

der Arbeitshyperämie und - bei der Vena mesenterica - mit Änderungen des Membranpotentials in Verbindung gebracht worden (JOHANSSON und JONSSON 1967, MELLANDER, JOHANSSON, GRAY, JONSSON, LUNDVALL und LJUNG 1967).

Aufgrund dieser divergierenden Auffassungen war es von Interesse, das Membranpotential von muskulären Arterien in seiner Beziehung zum Außenmilieu zu untersuchen. Als Untersuchungsobjekt wurde die Rinderfacialarterie gewählt, deren mechanische Reaktion auf Änderungen der K^+-Konzentration oder des osmotischen Druckes hinreichend bekannt ist (KONOLD, GEBERT und BRECHT 1968, BRECHT und GEBERT 1969).

Das Membranpotential wurde mit der Saccharose-Trennwand-Methode gemessen. Diese Methodik wurde von STÄMPFLI (1954) für Untersuchungen an markhaltigen Nerven beschrieben und von BURNSTOCK und STRAUB (1958) auf die glatte Muskulatur angewendet. Mikroelektroden sind durch die mechanische Belastung der Spitzen bei Tonusänderung der Gefäße, sowie durch die infolge der geringen Spitzendurchmesser auftretenden Tip-Potentiale weniger geeignet.

Zur Kontrolle der Funktion unserer Messanordnung wurden Vorversuche an der Taenia coli des Meerschweinchens durchgeführt. Die erhaltenen Potentialwerte stimmten mit den Befunden anderer Autoren (KURIYAMA 1963, BÜLBRING und KURIYAMA 1963) überein.

Methodik:

Die Untersuchungen wurden an Spiralstreifen der Rinderfacial-

arterie durchgeführt. Diese Arterien (0,5 - 2 mm Innendurchmesser) waren nach histologischer Untersuchung von muskulärem Typ und hatten fast ringförmige Muskulatur. Vor der Verwendung wurden sie von der Adventitia befreit, in Spiralstreifen geschnitten und ca. 1/2 Stunde unter 5 g Vorspannung in mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) durchperlter Tyrodelösung bei 37° C äquilibriert.

Die Messapparatur ist in Abbildung 1 dargestellt. In der Regel wurde die Potentialdifferenz zwischen N-Tyrode und der jeweiligen Testlösung gemessen. Lediglich bei einigen Messungen der KCl-Depolarisation diente isotonische K_2SO_4 als Bezugslösung.

Neben der Potentialdifferenz zwischen den beiden Ableitelektroden wurde bei einem Teil der Versuche der Gefäßtonus über einen mechanoelektrischen Wandler (Collins) isometrisch registriert. Die gesamte Apparatur wurde durch einen Faradaykäfig abgeschirmt.

Kontrolluntersuchungen ergaben, daß die verwendeten Zn-$ZnSO_4$-Elektroden eine Drift von weniger als 50 Mikrovolt in 30 Minuten aufwiesen.

Verwendete Lösungen: Als physiologische Lösung wurde N-Tyrode verwendet (mmol/l) NaCl 136,9; KCl 2,7; Glucose 8; $MgCl_2$ 0,5; $CaCl_2$ 1,4; $NaH\,CO_3$ 11,9; $NaH_2\,PO_4$ 0,3. In Tyrode-Lösungen mit vermehrtem KCl-Gehalt wurde das NaCl äquivalent vermindert. Isotonische K_2SO_4-Lösung (mmol/l) NaCl 3,3; Glucose 7,8;

MgCl 0,1; $CaCl_2$ 2,5; NaH_2PO_4 1,4; $KHCO_3$ 16,3; K_2SO_4 117,9. Der K_2SO_4-Gehalt wurde so gewählt, daß die Depolarisationslösung den gleichen osmotischen Druck wie die Tyrodelösung (290 mosmol) aufwies. Abgestufter K_2SO_4-Gehalt wurde durch Erhöhung der NaCl-Konzentration bei Verminderung der K_2SO_4-Konzentration und entsprechendem Ersatz von $KHCO_3$ durch $NaHCO_3$ erhalten, wobei der osmotische Druck konstant gehalten wurde.

Isotonische Na_2SO_4-Lösung (mmol/l) KCl 2,7; Glucose 8,0; $MgCl_2$ 0,5; $CaCl_2$ 1,4; $NaHCO_3$ 11,9; NaH_2PO_4 0,3; Na_2SO_4 108. Bei Verminderung der Na_2SO_4-Konzentration auf 40 mmol/l entsprechende Erhöhung von NaCl auf 86,9 mmol/l.

Hypertone Lösung: N-Tyrode + 100 mmol/l Saccharose.

Hypotone Lösung: N-Tyrode mit auf 96,8 mmol/l erniedrigtem NaCl-Gehalt.

Saccharose Lösung (mmol/l) Saccharose 280, Glucose 8. Die Saccharoselösung wurde mit destilliertem, jeweils frisch deionisiertem (Serdolit MB-Säule) Wasser zubereitet und höchstens 10 Stunden verwendet.

Alle Lösungen wurden durch Verwendung von Wärmeaustauschern auf 37° C eingestellt und - abgesehen von der Saccharoselösung - mit Carbogen durchperlt.

Der Innenwiderstand der gesamten Versuchsanordnung betrug während der Messungen 4 - 8 · 10^5 Ohm. Mit einem Baumwollfaden statt des Gefäßes wurden über 2 · 10^6 Ohm gemessen. Infolge des Kurzschlusses über die Saccharoselücke liegen die

gemessenen Potentiale daher um 10 - 20 % unter den tatsächlichen Werten.

Ergebnisse:

1.) Erhöhung der K^+-Konzentration.

Die Wirkung einer erhöhten K^+-Konzentration ist in Tab.1 für den Bereich von 5 bis ca. 140 mäqu/1 KCl zusammengefaßt. Die Standardabweichung der Einzelwerte wurde nur für Reihen von 4 und mehr Werten berechnet. Es wird deutlich, daß in dem Bereich dilatierender KCl-Konzentrationen (5 - 15 mmol/1) keine signifikante Änderung des Membranpotentials auftritt. Auch die Depolarisation bei hohen K^+-Konzentrationen ist vergleichsweise niedrig.

Die mechanische Reaktion der Gefäßstreifen (soweit gemessen) entsprach den Befunden von KONOLD, GEBERT und BRECHT (1968).

mäqu/1 KCl	Zahl der Versuche	Potential $\bar{X}$	S
5	9	0	0
10	10	0	0
15	5	0	0
20	9	2,3	0,8
25	3	3,3	
30	4	2,4	0,9
50	7	5,4	2,7
70	3	14,7	
139,6	4	23,3	7,9

Tabelle 1: Depolarisation von Spiralstreifen der A. facialis (Rind) durch steigende KCl-Konzentration.

2.) Erhöhung der K^+-Konzentration und/oder Ersatz von Cl^- durch SO_4^{--}.

Bei Verwendung von K_2SO_4 als Depolarisationslösung werden wesentlich höhere Potentiale als mit KCl erreicht (Tab. 2).

mäqu/l K_2SO_4	Zahl der Versuche	Potential $\bar{x}$	S
10	3	4,1	
20	4	5,5	2,4
30	1	7	
56,3	2	32	
176,3	2	47	
252,1	8	65,1	11,3

Tabelle 2: Depolarisation von Spiralstreifen der A. facialis (Rind) durch steigende K_2SO_4-Konzentration (NaCl osmotisch äquivalent erniedrigt).

Besonders deutlich wird das dadurch, daß schon bei relativ niedrigen K^+-Konzentrationen (10 und 20 mäqu/l) eine deutliche Depolarisation auftritt.

Zum direkten Vergleich zwischen der K^+-Wirkung in Form von KCl und K_2SO_4 muß die Wirkung auf die K^+-Aktivität bezogen werden. Die K^+-Aktivität in den einzelnen Lösungen wurde infolge der hohen Ionenstärken nicht nach der Debye-Hückel-Theorie, sondern nach den Glaselektrodenmessungen von GARRELS (1967) berechnet. Die Beziehungen zwischen Aktivität und Potential für die beiden Kaliumsalze ist in Abbildung 2 darge-

stellt. In dieser Abbildung wird deutlich, daß der stärkere Depolarisationseffekt der isotonen K_2SO_4-Lösung nicht nur auf der höheren K^+-Aktivität, sondern auch auf dem Ersatz von Cl^- durch SO_4^{--} beruht.

Um das Ausmaß der Cl^--Wirkung isoliert zu erfassen, wurden zusätzliche Versuche mit Na_2SO_4-Tyrode durchgeführt. Mit 80 mäqu/l Na_2SO_4 (osmotisch entsprechend 50 mäqu/l NaCl) wurde eine Depolarisation von ca. 6 mV und mit isotoner Na_2SO_4 eine Depolarisation von 18 $\pm$ 6,6 mV gemessen.

3.) Einfluß des osmotischen Druckes.

Veränderungen des osmotischen Druckes im Bereich von 210 bis 380 mosmol (insgesamt 10 Versuche) ließen keinen signifikanten Einfluß des osmotischen Milieus auf das Membranpotential erkennen. Die mechanische Reaktion auf Veränderungen des osmotischen Druckes in diesem Bereich waren ebenfalls kaum messbar.

Diskussion:

Aus den Messungen der durch KCl erzielten Depolarisation (maximale Steilheit pro Dekade K^+-Aktivitätszunahme = 36 mV) geht hervor, daß das Kalium für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials bei der arteriellen Gefäßmuskulatur keine absolut dominierende Rolle spielt, denn bei der durch K_2SO_4 hervorgerufenen Depolarisation beträgt die maximale Steilheit pro Dekade K^+-Aktivitätszunahme 59 mV. Zu ähnlichen Ergebnissen

kamen BURNSTOCK und STRAUB (1958) und KURIYAMA (1963) an der Taenia coli des Meerschweinchens und JOHANSSON und JONSSON an der Vena portae der Ratte. Vor allem trifft das für den Bereich bis ca. 20 mmol/l KCl zu. In diesem Bereich wurde keine signifikante Änderung des Membranpotentials gefunden. Die depolarisierende Wirkung eines Ersatzes von Cl^- durch SO_4^{--} mit und ohne gleichzeitige Erhöhung der K^+-Konzentration spricht für eine stärkere Beteiligung des Chlorids an der Entstehung des Membranpotentials. Auch in dieser Beziehung stimmt das Verhalten der arteriellen Gefäßmuskulatur mit dem der glatten Muskulatur anderer Lokalisation gut überein (KURIYAMA 1963, HOLMAN 1969).

Unsere Befunde sprechen nicht dafür, daß Membranpotentialveränderungen eine Rolle für die dilatierende Wirkung einer geringen Erhöhung der Kalium-Außenkonzentration spielen. Zu ähnlichen Schlüssen in Bezug auf den K^+-Konzentrationsgradienten kamen KONOLD et al. (1968), die keine Abhängigkeit zwischen dem K^+-Gradienten und der dilatierenden Wirkung von Kalium fanden. Diese Untersuchungen, die einen erheblichen Abfall der intracellulären K^+-Konzentration in vitro nachwiesen, sprechen für die Richtigkeit unserer Messungen, denn bei dem niedrigen K^+-Gradienten der Rinderfacialarterie in vitro sind in isotonischer KCl-Lösung keine höheren Depolarisationswerte zu erwarten. Andererseits stellen sie auch die Bedeutung der von uns in vitro gefundenen Unabhängigkeit zwischen Membranpotential und mechanischer Tonusentwicklung für die

Verhältnisse in vivo in Frage, bei denen ein erheblich höherer K^+-Konzentrationsgradient vorliegt.

Das Fehlen signifikanter Potentialänderungen unter dem Einfluß des osmotischen Druckes bei der Rinderfacialarterie läßt sich nicht direkt als Widerspruch zu den Befunden von JOHANSSON und JONSSON (1967) werten, die eine erhebliche Zunahme der Spontanaktivität an der Vena mesenterica bei steigendem osmotischen Druck fanden. Das Verhalten der verwendeten Präparate ist zu verschieden. Unsere Befunde stehen dagegen in Einklang mit den Untersuchungen von BRECHT et al. (1969), die an der Rinderfacialis nur einen geringen Einfluß des osmotischen Druckes auf den Gefäßtonus fanden.

Zusammenfassung

Das Membranpotential von Rinderfacialarterien wurde mit der Saccharose-Trennwand-Methode unter dem Einfluß verschiedener K^+-Konzentrationen, Cl^--Konzentrationen (Ersatz durch SO_4^{--}) und des osmotischen Druckes untersucht. Im Bereich bis 20 mäqu/l KCl wurde keine signifikante Depolarisation gefunden.

Ersatz von Cl^- durch SO_4^{--} führte zu einer Depolarisation (isotonische Na_2SO_4 = 18 $\pm$ 6,6 mV). Wenn die K^+-Konzentration gleichzeitig erhöht wird, depolarisiert der Streifen mehr als die Summe der Einzelwerte ergibt.

Variation des osmotischen Druckes verändert das Membranpotential nicht.

Die Befunde werden in Bezug auf die Rolle des Membranpotentials für die dilatierende Wirkung einer Erhöhung der K^+-Konzentration bzw. des osmotischen Druckes diskutiert.

Schlüsselwörter:
Muskuläre Arterie - Membranpotential - Saccharose-Trennwand - Kaliumeinfluß - Osmotischer Druck

Summary

The influence of K^+, Cl^- and osmotic pressure on the membrane-potential of helical strips from bovine facial artery has been studied by means of sucrose gap method. Increase in KCl concentration up to 20 mequ/l has no influence on the membrane potential. Isotonic KCl solution induces a depolarisation of $23,3 \pm 7,9$ mV. When all Cl^- was replaced by SO_4^{--}, the strips depolarized to about 18 mV. Application of isotonic K_2SO_4 depolarizes the artery by 65 mV. Change in osmotic pressure (range 210 - 380 mosmole) has no influence on the membrane potential of bovine facial artery. The results are discussed in respect to the role of membrane potential for the dilating effect of an increase in potassium or osmotic pressure.

Key-Words:
Muscular Artery - Membrane Potential - Sucrose Gap - Influence of Potassium - Osmotic Pressure

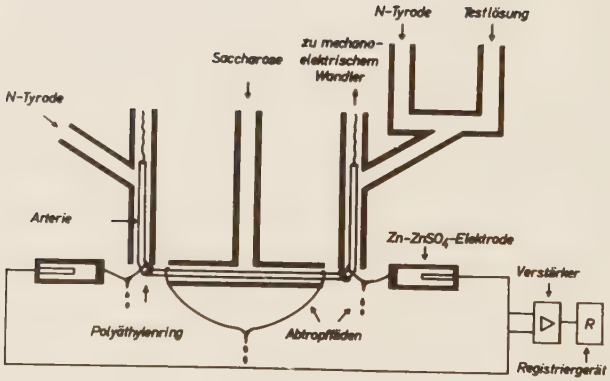

Abb. 1 Schematische Darstellung der Messanordnung der verwendeten Saccharose-Trennwand

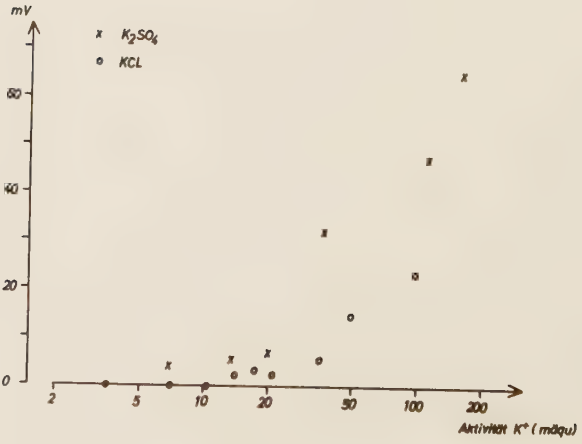

Abb. 2 Depolarisation von Rinderfacialarterien in K_2SO_4-Lösung (x) und KCl-Lösung (o) berechnet auf Aktivität K^+ (mäqu/l)

Literatur

BENNETT, M.R. and G. BURNSTOCK: Application of the sucrose-gap method to determine the ionic basis of the membrane potential of smooth muscle. J. Physiol. 183, 637-648 (1966)

BRECHT, K. and G. GEBERT: Effect of potassium on vascular smooth muscle. In "Physiology and the Pharmacology of Vascular Neuroeffector Systems". Symposion Interlaken 1969. Karger-Verlag Basel in press

BÜLBRING, E. and H. KURIYAMA: Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of Guinea pig taenia coli. J. Physiol. 166, 29 (1963)

BURNSTOCK, G. and R.W. STRAUB: A method for studying the effects of ions and drugs on the resting and action potentials in smooth muscle with external electrodes. J. Physiol. 140, 156-167 (1958)

DAWES, G.S.: The vaso-dilator action of potassium. J. Physiol. 99, 224-238 (1941)

GARRELS, R.M.: Ion-sensitive electrodes and individual ion activity coefficients. In "Glass-electrodes for Hydrogen and other cations. Principles and Practice". G. Eisenmann Ed., Marcel Dekker Inc., New York 1967

HOLMAN, M.E.: Electrophysiology of vascular smooth muscle. Ergebnisse der Physiologie 61, 137-177 (1969) Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York

JOHANSSON, B. and O. JONSSON: Cell volume as a factor influencing electrical and mechanical activity of vascular smooth muscle. Acta physiol. scand. 72, 456-468 (1967)

JOHANSSON, B. and O. JONSSON: Similarities between the vascular smooth muscle responses to sudden changes in external potassium, sodium and chloride ion concentrations. Acta physiol. scand. 73, 365-378 (1968)

KEATINGE, W.R.: Electrical and mechanical response of arteries to stimulation of sympathetic nerves. J. Physiol. 185, 701-715 (1966)

KJELLMER, J.: The potassium ion as a vasodilator during muscular exercise. Acta physiol. scand. 63, 460-468 (1965)

KJELLMER, J.: The role of potassium in exercise hyperaemia. Med. exp. 5, 56-60 (1961)

KONOLD, P., G. GEBERT und K. BRECHT: The effect of potassium on the tone of isolated arteries. Pflügers Arch. 301, 285-291 (1968)

KONOLD, P., G. GEBERT, H. NGUYEN-DUONG und K. BRECHT: Der Einfluß von Milieuänderung, Temperatur und Präparation auf den Ionengehalt und die Kalium-Dilatation muskulärer Arterien in vitro. Pflügers Arch. 310, 86-94 (1969)

KURIYAMA, H.: The influence of potassium, sodium and chloride on the membrane potential of the smooth muscle of Taenia coli. J. Physiol. 166, 15-28 (1963)

MELLANDER, S., B. JOHANSSON, S. GRAY, O. JONSSON, J. LUNDVALL and B. LJUNG: The effect of hyperosmolarity on intact and isolated vascular smooth muscle. Possible role in exercise hyperaemia. Angiologica 4, 310-322 (1967)

SKINNER, S.N. and W.J. POWELL: Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. Circ. Res. 20, 159-169 (1967)

SOMLYO, A.V. and A.P. SOMLYO: Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. exp. Therap. 129-145 (1968)

SOMLYO, A.V., CHI-JUAN WOO and A.P. SOMLYO: Effect of magnesium on posterior pituitary hormone action on vascular smooth muscle. Amer. J. Physiol.210, 705-714 (1966)

STÄMPFLI, R.: A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. Experientia 10, 508-509 (1954)

Lebenslauf

Am 30. 6. 1939 wurde ich, Frank Hillenbrand, als Sohn des Arztes Dr. Karl Hillenbrand und der Ärztin Dr. Aenne Hillenbrand, geborene Dey, in Tübingen geboren. Nach Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Pforzheim legte ich im Frühjahr 1960 meine Reifeprüfung ab. Von 1960 bis 1966 studierte ich in Freiburg / Breisgau Medizin (1961 naturwissenschaftliche, 1963 ärztliche Vorprüfung), wo ich im Herbst 1966 mein medizinisches Staatsexamen bestand.
Von Mai 1967 bis April 1969 leistete ich an verschiedenen Krankenhäusern und Instituten meine Medizinalassistentenzeit ab. Ende April 1969 erhielt ich meine Bestallung als Arzt. Seit 1. März 1969 bin ich Assistent am Physiologischen Institut der Universität Tübingen.